

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-89195

(P2004-89195A)

(43) 公開日 平成16年3月25日(2004.3.25)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>  
C12N 15/09F1  
C12N 15/00 ZNAAテーマコード(参考)  
4B024

審査請求 有 請求項の数 21 OL (全 28 頁)

(21) 出願番号 特願2003-306141 (P2003-306141)  
 (22) 出願日 平成15年8月29日(2003.8.29)  
 (31) 優先権主張番号 02019097.1  
 (32) 優先日 平成14年8月29日(2002.8.29)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁(EP)  
 (31) 優先権主張番号 02028114.3  
 (32) 優先日 平成14年12月18日(2002.12.18)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(71) 出願人 591003013  
 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー  
 F. HOFFMANN-LA ROCH  
 E AKTIENGESELLSCHAFT  
 スイス・シーエイチ-4070バーゼル・  
 グレンツァーヘルストラッッセ124  
 (74) 代理人 100095832  
 弁理士 細田 芳徳  
 (72) 発明者 クリスティーネ マルカート-ハーン  
 ドイツ連邦共和国 ベンツベルク 823  
 77 ゼールヴァイヘルシュトラッセ 5  
 4

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 亜硫酸水素塩処理のための改善された方法

## (57) 【要約】

【課題】 手動により容易に実施できる亜硫酸水素塩反応、慣用的な分析装置により取扱うことができる固相、とりわけ磁性ガラス粒子を使用する亜硫酸水素塩反応、ならびに、核酸が亜硫酸水素塩反応の成功に影響し得る種々の相互作用により固相の表面に結合されるので、満足のいく様式で首尾よく実施可能な亜硫酸水素塩反応を提供すること。

【解決手段】 核酸が脱アミノ工程および／または脱スルホン化工程中に固相に結合されていることを特徴とする、核酸中のシトシン塩基のウラシル塩基への変換方法、核酸中のシトシン塩基が亜硫酸水素イオンの存在下でウラシル塩基に変換される反応の脱アミノ工程および／または脱スルホン化工程における固相の使用、ならびに亜硫酸水素イオンを含む溶液および固相を含んでなる亜硫酸水素塩反応を実施するためのキット。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

核酸が脱アミノ工程および／または脱スルホン化工程中に固相に結合されていることを特徴とする、核酸中のシトシン塩基のウラシル塩基への変換方法。

## 【請求項 2】

a) 核酸を固相に結合する工程、  
b) 亜硫酸水素イオンの存在下で固相結合核酸をインキュベートし、それにより核酸が脱アミノされる工程、  
c) 脱アミノ固相結合核酸を任意に洗浄する工程、  
d) アルカリ条件下で脱アミノ固相結合核酸をインキュベートし、それにより脱アミノ核 10  
酸が脱スルホン化される工程、  
e) 脱アミノ脱スルホン化固相結合核酸を任意に洗浄する工程、および  
f) 固相から脱アミノ脱スルホン化核酸を任意に溶出する工程  
を含む、請求項 1 記載の核酸中のシトシン塩基のウラシル塩基への変換方法。

## 【請求項 3】

a) 亜硫酸水素イオンの存在下で核酸をインキュベートし、それにより核酸が脱アミノされる工程、  
b) 脱アミノ核酸を固相に結合する工程、  
c) 脱アミノ固相結合核酸を任意に洗浄する工程、  
d) アルカリ条件下で脱アミノ固相結合核酸をインキュベートし、それにより脱アミノ核 20  
酸が脱スルホン化される工程、  
e) 脱アミノ脱スルホン化固相結合核酸を任意に洗浄する工程、および  
f) 固相から脱アミノ脱スルホン化核酸を任意に溶出する工程  
を含む、請求項 1 記載の核酸中のシトシン塩基のウラシル塩基への変換方法。

## 【請求項 4】

a) 核酸を固相に結合する工程、  
b) 亜硫酸水素イオンの存在下で固相結合核酸をインキュベートし、それにより核酸が脱アミノされる工程、  
c) 固相結合核酸を任意に洗浄する工程、  
d) 固相から脱アミノ核酸を溶出する工程、および  
e) アルカリ条件下で脱アミノ核酸をインキュベートし、それにより脱アミノ核酸が脱ス 30  
ルホン化される工程  
を含む、請求項 1 記載の核酸中のシトシン塩基のウラシル塩基への変換方法。

## 【請求項 5】

固相がシリカまたはガラスを含む材料であることを特徴とする請求項 1 ～ 4 いずれか記載の方法。

## 【請求項 6】

固相がガラスフリースまたはガラス膜であることを特徴とする請求項 1 ～ 5 いずれか記載の方法。

## 【請求項 7】

固相が磁性ガラス粒子であることを特徴とする請求項 1 ～ 5 いずれか記載の方法。 40

## 【請求項 8】

磁性ガラス粒子が  $0.5 \mu\text{m} \sim 5 \mu\text{m}$  の平均直径を有することを特徴とする請求項 7 記載の方法。

## 【請求項 9】

磁性ガラス粒子が  $5 \sim 500 \text{ nm}$  の直径を有する磁性物体を含むことを特徴とする請求項 7 または 8 記載の方法。

## 【請求項 10】

磁性ガラス粒子が  $23 \text{ nm}$  の平均直径を有する磁性物体を含むことを特徴とする請求項 9 記載の方法。 50

## 【請求項 1 1】

磁性ガラス粒子がゾルーゲル法により製造されることを特徴とする請求項 7 ～ 1 0 いずれか記載の方法。

## 【請求項 1 2】

前記ゾルーゲル法が

- a) ゾル中で磁性物体を懸濁する工程、
  - b) 該ゾルを加水分解して磁性物体をゲルで覆う工程、
  - c) ツーノズル噴霧乾燥機中でゲルで覆われた磁性物体を噴霧乾燥する工程、および
  - d) 噴霧乾燥粉末を焼結して磁性物体を覆うゲルからガラスを形成する工程
- を含む、請求項 1 1 記載の方法。

10

## 【請求項 1 3】

核酸中のシトシン塩基が亜硫酸水素イオンの存在下でウラシル塩基に変換される反応の脱アミノ工程および／または脱スルホン化工程における固相の使用。

## 【請求項 1 4】

固相がシリカまたはガラスを含む材料である請求項 1 3 記載の使用。

## 【請求項 1 5】

固相がガラスフリースまたはガラス膜である請求項 1 3 または 1 4 記載の使用。

## 【請求項 1 6】

固相が磁性ガラス粒子である請求項 1 3 または 1 4 記載の使用。

## 【請求項 1 7】

亜硫酸水素イオンを含む溶液および固相を含んでなる亜硫酸水素塩反応を実施するためのキット。

20

## 【請求項 1 8】

固相がシリカまたはガラスを含む物質である請求項 1 7 記載のキット。

## 【請求項 1 9】

固相がガラスフリースまたはガラス膜である請求項 1 7 または 1 8 記載のキット。

## 【請求項 2 0】

固相が磁性ガラス粒子である請求項 1 7 または 1 8 記載のキット。

## 【請求項 2 1】

核酸中のシトシン塩基が亜硫酸水素イオンの存在下でウラシル塩基に変換される反応のための請求項 1 7 ～ 2 0 いずれか記載のキットの使用。

30

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

本出願は、核酸におけるメチル化の位置、すなわちメチル化および非メチル化シトシンを決定するために、亜硫酸水素塩反応を実施し、それにより、核酸が亜硫酸水素塩反応の脱アミノ工程および／または脱スルホン化工程の間に固相に結合される方法に関する。固相は、好ましくは、ガラスまたはシリカ、より好ましくは、ガラスフリース、ガラス膜または磁性ガラス粒子を含む材料である。さらに、亜硫酸水素塩反応の脱アミノ工程および／または脱スルホン化工程の間に核酸を結合するための固相の使用並びに亜硫酸水素塩試薬および固相を含有するキットが開示される。

40

## 【背景技術】

## 【0 0 0 2】

遺伝子は、全哺乳動物ゲノムのわずかな部分のみを構成し、そして非コード化デオキシリボ核酸 (DNA) のバックグラウンドの圧倒的な存在のもとでのその発現の正確な制御は、その調節に関する実質的な問題を提示する。イントロン、反復エレメントおよび潜在的活性化転位因子を含む非コード化DNAは、その長期間サイレンシングに有効なメカニズムを必要とする。哺乳動物は、シトシンメチル化により提供される可能性を利用して、DNA-タンパク質相互作用を変化させる遺伝性メカニズムを提供し、かかるサイレンシングを援助しているようである。DNAメチル化は、哺乳動物の発達に必須であり；そして加齢およ

50

び癌に潜在的役割を果たす。遺伝子発現の調節における、および刷り込まれた遺伝子をマークする後成的修飾としてのメチル化の関与は、十分に確立されている。哺乳動物では、メチル化は、シトシン残基においてのみ、そしてより具体的には、グアノシン残基に隣接するシトシン残基においてのみ、すなわちCG配列で生じる。DNAメチル化部位の検出およびマッピングは、所定の配列がメチル化されているかどうかを示す分子シグナルの理解のために必須の工程である。

【 0 0 0 3 】

これは、現在、5-メチルシトシンの検出に関して、いわゆる亜硫酸水素塩法により達成されている（例えば、非特許文献 1 参照）。5-メチルシトシンをマッピングする亜硫酸水素塩法は、亜硫酸水素ナトリウムがシトシンと反応するが、5-メチルシトシンとは全くま  
たはわずかししか反応しないという影響を用いている。シトシンは、亜硫酸水素塩と反応して、アルカリ性条件下でウラシルに脱スルホン化され得るスルホン化ウラシルを生じる脱  
アミノしやすいスルホン化シトシン反応中間体を形成する。ウラシルが、遊離体シトシン  
とは異なるチミンの塩基対合挙動を有し、一方5-メチルシトシンが、シトシンの塩基対合  
挙動を有することは一般的な知識である。これにより、例えば亜硫酸水素塩ゲノムシーケ  
ンシングまたはメチル化特異的PCR (MSP) によるメチル化または非メチル化シトシンの区  
別が可能となる（例えば、非特許文献 2、非特許文献 3 または特許文献 1 参照）。

【 0 0 0 4 】

亜硫酸水素塩反応の特定の局面を扱う種々の文献があり（例えば、非特許文献 4 参照）、5-メチルデオキシシトシンおよびデオキシシトシンの亜硫酸水素塩修飾に対して一般的  
な研究を行い（例えば、非特許文献 5 参照）、亜硫酸水素塩塩基シーケンシングの方法を  
開示し、それにより亜硫酸水素塩処理および続くPCR工程がアガロースビーズに包埋した  
材料上で実施される。亜硫酸水素塩法では、脱アミノの後、サンプルが脱塩される（例え  
ば、非特許文献 6 参照）。

【 0 0 0 5 】

鑄型分解を最小にする5-メチルシトシンマッピングの亜硫酸水素塩法を開示している（  
例えば、非特許文献 7 参照）。彼らは、pH、温度および反応時間の影響を研究している。  
同様の研究がなされている（例えば、非特許文献 8 または非特許文献 9 参照）。亜硫酸水  
素塩混合物における種々のさらなる成分が、開示されている（例えば、特許文献 2 または  
非特許文献 10 参照）。亜硫酸水素塩処理およびPCRの後のさらなる亜硫酸水素塩工程が  
開示されている（例えば、特許文献 3 参照）。オリゴデオキシリボヌクレオチドにおける  
シトシンの亜硫酸水素塩誘導脱アミノの触媒について研究されている（例えば、非特許文  
献 11 参照）。

【 0 0 0 6 】

亜硫酸水素塩処理を実施するためのキットは、Serologicals Corporation, Norcross G  
A, USAにより提供されるIntergenから市販され、例えばCpGenome<sup>TM</sup> DNA修飾キットである  
。

【 0 0 0 7 】

脱アミノの後、ゲノムDNAが、ガラスビーズに結合され、洗浄される、亜硫酸水素塩ゲ  
ノムシーケンシングの変法が、開示されている（例えば、非特許文献 12 参照）。溶出後  
、核酸は脱スルホン化される。核酸のガラス表面への結合挙動、例えばシリカゲルまたは  
2価土類に対する吸着、磁性ガラス粒子 (MGP) またはカオトロピック条件下での有機シラ  
ン粒子への吸着を用いることにより核酸が単離され得ることは公知である。固相を用いる  
抽出は、通常、目的の物質の固相への結合を可能にする条件下で、核酸を含有する溶液を  
固相に添加し、固相結合核酸の残りの溶液の除去、および続いて固相から液状溶出液への  
核酸の放出（しばしば溶出と称する）の工程を含む。かかる方法の結果は、通常溶解した  
状態で目的の物質を含有する溶液である。

【特許文献 1】 米国特許第5786146号明細書

【特許文献 2】 国際公開第01/98528号パンフレット

【特許文献 3】 国際公開第02/31186号パンフレット

【非特許文献 1】フロマー・エム (Frommer, M.) ら、「Proc. Natl. Acad. Sci. USA」、1992年、第89巻、p.1827-1831

【非特許文献 2】グリッグ・ジー (Grigg, G.) およびクラーク・エス (Clark, S.)、「Bioessays」、1994年、第16巻、p.431-436

【非特許文献 3】グリッグ・ジー・ダブリュー (Grigg, G.W.)、「DNA Seq」、1996年、第6巻、p.189-198

【非特許文献 4】ベンヤジャティ・シー (Benyajati, C.) ら、「Nucleic Acids Res.」、1980年、第8巻、p.5649-5667

【非特許文献 5】オレク・エー (Olek, A.) ら、「Nucleic Acids Res.」、1996年、第24巻、p.5064-5066

10

【非特許文献 6】クラーク・エス・ジェー (Clark, S.J.) ら、「Nucleic Acids Res.」、1994年、第22巻、p.2990-2997

【非特許文献 7】ライジス・エー・エム (Raizis, A.M.) ら、「Anal. Biochem.」1995年、第226巻、p.161-166

【非特許文献 8】グラノウ・シー (Grunau, C.) ら、「Nucleic Acids Res.」、2001年、第29巻、p.E65-5

【非特許文献 9】ワルネケ・ピー・エム (Warnecke, P.M.) ら、「Methods」、2002年、第27巻、p.101-107

【非特許文献 10】ポウリン・アール (Paulin, R.) ら、「Nucleic Acids Res.」、1998年、第26巻、p.5009-5010

20

【非特許文献 11】コミヤマ・エム (Komiyama, M.) およびオオシマ・エス (Oshima, S.)、「Tetrahedron Letters」、1994年、第35巻、p.8185-8188

【非特許文献 12】フェイル・アール (Feil, R.) ら、「Nucleic Acids Res.」、1994年、第22巻、p.695-696

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

亜硫酸水素塩処理に関する全ての先行技術の方法には欠点がある。従って、本発明により解決されるべき問題は、先行技術の方法の欠点を打破する方法を提供することであった。

30

【0009】

本発明の目的は、慣用的な分析装置を利用できない小規模な研究室では、手動により容易に実施できる亜硫酸水素塩反応を提供し、大量のサンプル処理能力を有している大規模な研究室では、慣用的な分析装置により取扱うことができる固相、とりわけ磁性ガラス粒子を使用する亜硫酸水素塩反応を提供し、核酸が亜硫酸水素塩反応の成功に影響し得る種々の相互作用により固相の表面に結合されるので、満足のいく様式で首尾よく実施可能な亜硫酸水素塩反応を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0010】

すなわち、本発明は、

40

(1) 核酸が脱アミノ工程および／または脱スルホン化工程中に固相に結合されていることを特徴とする、核酸中のシトシン塩基のウラシル塩基への変換方法、

(2) a) 核酸を固相に結合する工程、

b) 亜硫酸水素イオンの存在下で固相結合核酸をインキュベートし、それにより核酸が脱アミノされる工程、

c) 脱アミノ固相結合核酸を任意に洗浄する工程、

d) アルカリ条件下で脱アミノ固相結合核酸をインキュベートし、それにより脱アミノ核酸が脱スルホン化される工程、

e) 脱アミノ脱スルホン化固相結合核酸を任意に洗浄する工程、および

f) 固相から脱アミノ脱スルホン化核酸を任意に溶出する工程

50

を含む、前記 ( 1 ) 記載の核酸中のシトシン塩基のウラシル塩基への変換方法、

( 3 ) a) 亜硫酸水素イオンの存在下で核酸をインキュベートし、それにより核酸が脱アミノされる工程、

b) 脱アミノ核酸を固相に結合する工程、

c) 脱アミノ固相結合核酸を任意に洗浄する工程、

d) アルカリ条件下で脱アミノ固相結合核酸をインキュベートし、それにより脱アミノ核酸が脱スルホン化される工程、

e) 脱アミノ脱スルホン化固相結合核酸を任意に洗浄する工程、および

f) 固相から脱アミノ脱スルホン化核酸を任意に溶出する工程

を含む、前記 ( 1 ) 記載の核酸中のシトシン塩基のウラシル塩基への変換方法、

10

( 4 ) a) 核酸を固相に結合する工程、

b) 亜硫酸水素イオンの存在下で固相結合核酸をインキュベートし、それにより核酸が脱アミノされる工程、

c) 固相結合核酸を任意に洗浄する工程、

d) 固相から脱アミノ核酸を溶出する工程、および

e) アルカリ条件下で脱アミノ核酸をインキュベートし、それにより脱アミノ核酸が脱スルホン化される工程

を含む、前記 ( 1 ) 記載の核酸中のシトシン塩基のウラシル塩基への変換方法、

( 5 ) 固相がシリカまたはガラスを含む材料であることを特徴とする前記 ( 1 ) ~ ( 4 ) いずれか記載の方法、

20

( 6 ) 固相がガラスフリースまたはガラス膜であることを特徴とする前記 ( 1 ) ~ ( 5 ) いずれか記載の方法、

( 7 ) 固相が磁性ガラス粒子であることを特徴とする前記 ( 1 ) ~ ( 5 ) いずれか記載の方法、

( 8 ) 磁性ガラス粒子が  $0.5 \mu\text{m} \sim 5 \mu\text{m}$  の平均直径を有することを特徴とする前記 ( 7 ) 記載の方法、

( 9 ) 磁性ガラス粒子が  $5 \sim 500 \text{ nm}$  の直径を有する磁性物体を含むことを特徴とする前記 ( 7 ) または ( 8 ) 記載の方法、

( 10 ) 磁性ガラス粒子が  $23 \text{ nm}$  の平均直径を有する磁性物体を含むことを特徴とする前記 ( 9 ) 記載の方法、

30

( 11 ) 磁性ガラス粒子がゾル-ゲル法により製造されることを特徴とする前記 ( 7 ) ~ ( 10 ) いずれか記載の方法、

( 12 ) 前記ゾル-ゲル法が

a) ゾル中で磁性物体を懸濁する工程、

b) 該ゾルを加水分解して磁性物体をゲルで覆う工程、

c) ツーノズル噴霧乾燥機中でゲルで覆われた磁性物体を噴霧乾燥する工程、および

d) 噴霧乾燥粉末を焼結して磁性物体を覆うゲルからガラスを形成する工程

を含む、前記 ( 11 ) 記載の方法、

( 13 ) 核酸中のシトシン塩基が亜硫酸水素イオンの存在下でウラシル塩基に変換される反応の脱アミノ工程および/または脱スルホン化工程における固相の使用、

40

( 14 ) 固相がシリカまたはガラスを含む材料である前記 ( 13 ) 記載の使用、

( 15 ) 固相がガラスフリースまたはガラス膜である前記 ( 13 ) または ( 14 ) 記載の使用、

( 16 ) 固相が磁性ガラス粒子である前記 ( 13 ) または ( 14 ) 記載の使用、

( 17 ) 亜硫酸水素イオンを含む溶液および固相を含んでなる亜硫酸水素塩反応を実施するためのキット、

( 18 ) 固相がシリカまたはガラスを含む物質である前記 ( 17 ) 記載のキット、

( 19 ) 固相がガラスフリースまたはガラス膜である前記 ( 17 ) または ( 18 ) 記載のキット、

( 20 ) 固相が磁性ガラス粒子である前記 ( 17 ) または ( 18 ) 記載のキット、ならび

50

に

( 2 1 ) 核酸中のシトシン塩基が亜硫酸水素イオンの存在下でウラシル塩基に変換される反応のための前記 ( 1 7 ) ~ ( 2 0 ) いずれか記載のキットの使用に関する。

【発明の効果】

【 0 0 1 1 】

本発明による方法は、手動により容易に実施でき、従って慣用的な分析装置を利用できない小規模な研究室に適している。大量のサンプル処理能力を有している大規模な研究室では、慣用的な分析装置により取扱うことができる固相、とりわけ磁性ガラス粒子の使用が有利である。さらに、本発明において、核酸は、亜硫酸水素塩反応の成功に影響し得る種々の相互作用により固相の表面に結合されるので、満足のいく様式で首尾よく亜硫酸水素塩反応を実施できる。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 1 2 】

前記で論じた問題は、核酸中のシトシン塩基、好ましくは、複数のシトシン塩基がウラシル塩基、好ましくは、複数のウラシル塩基へ変換され、5-メチルシトシン塩基は有意には変換されず ( 「亜硫酸水素塩反応」または「亜硫酸水素塩処理」 ) 、それにより亜硫酸水素塩反応の脱アミノ工程および／または脱スルホン化工程の間に核酸が固相に結合される方法を提供することにより解決される。好ましくは、固相は、ガラスフリース、ガラス膜または磁性ガラス粒子である。さらに本発明は、亜硫酸水素塩反応の脱アミノ工程および／または脱スルホン化工程における固相の使用並びに亜硫酸水素塩反応を実施するための固相および試薬を含有するキットを開示する。

20

【 0 0 1 3 】

亜硫酸水素塩反応の脱アミノ工程および／または脱スルホン化工程の間の、好ましくは、脱スルホン化工程での固相の使用は、取扱いが簡単で、および／または容易に自動化できるという利点を有している。例えば、ガラスフリースを脱アミノ工程および／または脱スルホン化工程に用いる場合、時間のかかるDNA沈降反応が必要でなく；非結合分離を遠心分離により容易に達成でき、ガラスフリースの死空間は、無視でき、従って洗浄工程が非常に有効である。潜在的インヒビターが感受性を有意に低減し得るPCRに亜硫酸水素塩処理DNAを用いる場合にこれは有利である。本発明による方法を手動により容易に実施でき、従って慣用的な分析装置を利用できない小規模な研究室に適している。大量のサンプル処理能力を有している大規模な研究室では、慣用的な分析装置により取扱うことができる固相、とりわけ磁性ガラス粒子の使用が有利である。慣用的な亜硫酸水素塩反応では、亜硫酸水素塩が塩基対合に関与しないピリミジンとのみ反応できるような変性条件を選択する。従って、核酸は、亜硫酸水素塩反応の成功に影響し得る種々の相互作用により固相の表面に結合されるので、本発明による方法により満足のいく様式で首尾よく亜硫酸水素塩反応を実施できることは驚くべきことである。

30

【 0 0 1 4 】

本発明によれば、「亜硫酸水素塩反応」、「亜硫酸水素塩処理」または「亜硫酸水素塩法」なる用語は、好ましくは亜硫酸水素イオンの存在下、核酸中のシトシン塩基、とりわけ複数のシトシン塩基がウラシル塩基または複数の塩基へ変換され、好ましくは5-メチルシトシン塩基が有意には変換されない反応を意味する。メチル化シトシンの検出のためのこの反応は、Frommerら ( 前出 ) およびGriggおよびClark ( 前出 ) により詳細に記載されている。亜硫酸水素塩反応は、別個にまたは同時に行われ得る脱アミノ工程および脱スルホン化工程を含む ( 図1; GriggおよびClark ( 前出 ) を参照 ) 。5-メチルシトシン塩基は、有意に変換されないという記述は、わずかな5-メチルシトシン塩基がウラシルに変換されるということを排除できないが、 ( 非メチル化 ) シトシン塩基のみおよび ( 非メチル化 ) シトシン塩基を排他的に変換することを意図するというその事実だけを考慮している ( Frommerら、前出 ) 。

40

【 0 0 1 5 】

50

本発明の方法は、亜硫酸水素塩反応および固定化工程のいくつかの取り合わせにおいて実施することができる。最初の態様では、核酸が固相に結合される間に脱アミノ工程および脱スルホン化工程を行う。従って、本発明の好ましい態様では、

- a) 核酸を固相に結合する工程、
  - b) 亜硫酸水素イオンの存在下で固相結合核酸をインキュベートし、それにより核酸が脱アミノされる工程、
  - c) 脱アミノ固相結合核酸を任意に洗浄する工程、
  - d) アルカリ条件下で脱アミノ固相結合核酸をインキュベートし、それにより脱アミノ核酸が脱スルホン化される工程、
  - e) 脱アミノ脱スルホン化固相結合核酸を任意に洗浄する工程、ならびに
  - f) 固相から脱アミノ脱スルホン化核酸を任意に溶出する工程
- を含む、核酸中のシトシン塩基、好ましくは、複数のシトシン塩基のウラシル塩基、好ましくは、複数のウラシル塩基への変換（「亜硫酸水素塩反応」）、それにより、好ましくは、5-メチルシトシン塩基は有意に変換されない方法が開示されている。

【 0 0 1 6 】

本発明の第2の態様では、脱スルホン化工程は、核酸が固相に結合されている間に行われる。従って、本発明の別の好ましい態様では、

- a) 亜硫酸水素イオンの存在下で核酸をインキュベートし、それにより核酸が脱アミノされる工程、
  - b) 脱アミノ核酸を固相に結合する工程、
  - c) 脱アミノ固相結合核酸を任意に洗浄する工程、
  - d) アルカリ条件下で脱アミノ固相結合核酸をインキュベートし、それにより脱アミノ核酸が脱スルホン化される工程、
  - e) 脱アミノ脱スルホン化固相結合核酸を任意に洗浄する工程、ならびに
  - f) 固相から脱アミノ脱スルホン化核酸を任意に溶出する工程
- を含む、核酸中のシトシン塩基、好ましくは複数のシトシン塩基のウラシル塩基、好ましくは複数のウラシル塩基への変換（「亜硫酸水素塩反応」）、それにより、5-メチルシトシン塩基は有意に変換されない方法が開示されている。

【 0 0 1 7 】

本発明の第3の態様では、脱アミノ工程は核酸が固相に結合されている間に行われる。従って、本発明の別の好ましい態様では、

- a) 核酸を固相に結合する工程、
  - b) 亜硫酸水素イオンの存在下で固相結合核酸をインキュベートし、それにより核酸が脱アミノされる工程、
  - c) 固相結合核酸を任意に洗浄する工程、
  - d) 固相から脱アミノ核酸を溶出する工程
  - e) アルカリ条件下で脱アミノ核酸をインキュベートし、それにより脱アミノ核酸が脱スルホン化される工程
- を含む、核酸中のシトシン塩基、好ましくは複数のシトシン塩基のウラシル塩基、好ましくは複数のウラシル塩基への変換（「亜硫酸水素塩反応」）、それにより、5-メチルシトシン塩基は有意に変換されない方法が開示されている。

【 0 0 1 8 】

当業者は、例えば亜硫酸水素塩反応の主要なパラメーターを開示するFrommerら（前出）またはGriggおよびClark（前出）を参照することにより、亜硫酸水素塩反応を実施する方法を知っている。Grunauら（前出）から、亜硫酸水素塩法の変法が可能であることは当業者には公知である。脱アミノ効率およびDNA分解に影響するパラメーターへのインキュベーション時間および温度の影響は開示されている。要約すると、脱アミノ工程では、亜硫酸水素イオンを含有する緩衝液、場合によっては、カオトロピック剤および場合によってはアルコールのようなさらなる試薬またはヒドロキノリンのような安定剤を用い、そしてpHは酸性の範囲内である。亜硫酸水素塩の濃度は、0.1から6M亜硫酸水素塩であり、好ま

10

20

30

40

50



しくは、1Mから5.5Mであり、カオトロピック剤の濃度は、1から8Mであり、それにより、好ましくは、グアニジニウム塩を用い、pHは、酸性の範囲内、好ましくは、4.5から6.5であり、温度は、0℃から90℃、好ましくは、室温（25℃）から90℃であり、そして反応時間は、30分から24時間または48時間またはそれ以上、好ましくは、1時間から24時間である。脱スルホン化工程は、例えば、水酸化物（例えば、水酸化ナトリウム）のみを含有する溶液、またはエタノール、塩化ナトリウムおよび水酸化ナトリウムを含有する溶液（例えば38% EtOH、100mM NaCl、200mM NaOH）として、アルカリ性溶液または緩衝液を添加し、室温でまたは高温で数分、好ましくは5分から60分インキュベートすることにより実施される。

## 【 0 0 1 9 】

10

本発明の態様では、核酸は、デオキシリボ核酸（DNA）であり、とりわけゲノムDNAまたは核酸、すなわち生物のゲノムで見出され、そして生存に必要な情報として子孫に継代されるDNAまたは核酸である。別の型のDNA、例えばプラスミド内で見出されるものと区別するためにこの用語を用いる。核酸の供給源は、真核または原核細胞性でよく、好ましくは脊椎動物、特に哺乳動物、最も好ましくは動物またはヒトに由来するものでよい。

## 【 0 0 2 0 】

20

本発明の態様では、核酸は、固相に結合しており、固相は、修飾されていない、すなわち核酸は、固相への結合を媒介する化合物なしで直接結合される。核酸は、固相の非修飾表面に結合し、それにより、表面への結合は、固相が孔を含有し、そして核酸が固相の孔の中の表面に結合され得ることをも考慮に入れる。本発明による態様では、固相は、好ましくは非修飾表面を有し、特定の条件下で核酸を結合できるイオン交換体（Amersham Biosciences Europe, Freiburg, Germanyより市販される）、ヒドロキシルアパタイト（Sigma, Taufkirchen, Germanyより市販される）、ガラスもしくはシリカ、またはガラスもしくはシリカを含んでなる材料でよい。別の態様では、固相は修飾されている、すなわち固相は、固相への結合を媒介する化合物を用いて、例えば表面に付着するオリゴヌクレオチドまたはビオチン標識DNAに結合しているストレプトアビジン（固相の表面に付着している）への核酸の配列が特異的な結合により、核酸を間接的に結合する。従って適切な粒子は、DYNAL, Oslo, Norwayから市販され、例えばW090/064045に記載されている。

## 【 0 0 2 1 】

30

「非修飾」なる用語は、さらなる化学的修飾が存在しない、すなわち他の化学基が共有結合的に、または非共有結合的に付着されないことを意味する。「非修飾表面」、「非修飾シリカ表面」または「非修飾ガラス表面」なる用語は、核酸が中間物質に結合し、そしてシリカ表面そのものには結合していない、核酸結合のための中間物質として提供される他の化学基が共有結合的に、または非共有結合的に付着していないことを意味する。従って、核酸は、好ましくは水素結合および別の原子力により「非修飾表面」に直接結合する。修飾されている表面の実例は、配列特異的な様式で核酸分子を結合するオリゴヌクレオチドが付着しているシリカ表面である。修飾されたシリカ表面に関する別の例は、ビオチン化されたDNA分子に結合しているストレプトアビジンでコートされたシリカ表面である。

## 【 0 0 2 2 】

40

本発明による特定の好ましい態様では、固相は、好ましくは非修飾（ガラスまたはシリカ）表面を有するガラスまたはシリカを含む材料、例えばグラスファイバーまたは珪藻土、ガラスビーズもしくは粒子、ガラス膜もしくは磁性ガラス粒子、または非修飾ガラス表面で被覆された他の物質である。とりわけ好ましいのは、ガラスフリースまたはガラス膜または磁性ガラス粒子である。かかる固相は、例えば欧州特許第0389063号または米国特許第5234809号にて開示されている。

## 【 0 0 2 3 】

DNAまたは核酸をガラスまたはシリカ表面へ結合する条件は、基本的には当業者に公知である。この方法は、種々の文献において詳細に記載されている。Vogelstein, B.およびGillespie, D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:615-619 (1979) では、例えばヨウ化

50

ナトリウムの存在下、アガロースゲル由来の核酸を研磨フリントガラスへ結合する方法が提示されている。過塩素酸ナトリウムの存在下、ガラス粉末上の細菌由来のプラスミドDNAの精製がMarko, M.A.ら、Anal. Biochem.121:382-387(1982)に記載されている。DE-A

3734442では、酢酸を用いてファージ粒子を沈殿することによるグラスファイバーフィルター上の一本鎖M13ファージDNAの単離および過塩素酸塩でのファージ粒子の溶解が記載されている。グラスファイバーフィルターに結合している核酸を洗浄し、次いでメタノール含有Tris/EDTA緩衝液で溶出する。ラムダファージからDNAを精製するための類似の手順がJakobi, R.ら、Anal. Biochem.175:196-201(1988)に記載されている。手順は、カオトロピック塩溶液中、核酸のガラス表面への選択的結合および夾雑物、例えばアガロース、タンパク質または細胞残留物からの核酸の分離を必要とする。ガラス粒子を夾雑物から分離するために、粒子が遠心分離されるか、またはグラスファイバーフィルターを通して液体が抜き取られ得る。しかしながら、これは、その手順を大量のサンプルを処理するのに用いることが妨げられる限定的な工程である。本発明の好ましい態様では、例えばAlderton, R.P.ら、Anal. Biochem.201:166-169(1992)およびPCT GB91/00212に記載されているように、塩およびエタノールを添加することにより沈殿させた後、磁性ガラス粒子を用いて核酸を結合する。

10

【0024】

本発明の非常に好ましい態様では、固相は、好ましくは非修飾ガラス表面を有している磁性ガラス粒子である。磁性ガラス粒子は、ガラス中の小型の磁性核の固体分散物であり、すなわちこれは、非常に小型の磁性の物体が分散されているガラス小滴である。磁性体と称されるこの物体は、磁石、すなわち例えばフェリもしくは強磁性または超常磁性材料に引き付けられる。常磁性物質は、磁石には極弱くしか引き付けられないので有用ではなく、これは本発明による方法には十分でない。好ましいのは、とりわけ未だ前磁化されていない場合の、フェリまたは強磁性材料である。この局面では、前磁化は、残留磁気を増加させる磁石と接触させることを意味すると理解される。好ましい磁性材料は、鉄または酸化鉄、例えば磁鉄鉱( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )または、 $\text{Fe}_2\text{O}_3$ 好ましくは $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ である。原則的には、バリウム・フェライト、ニッケル、コバルト、Al-Ni-Fe-Co合金またはその他のフェリもしくは強磁性材料を用いることができる。本発明によりとりわけ好ましいのは、W096/41811、W000/32762およびW001/37291に記載されている磁性ガラス粒子である。

20

【0025】

本発明の非常に好ましい態様では、鉄は続く増幅反応のインヒビターである、すなわち、鉄は、酵素インヒビターであるので、磁性ガラス粒子は、低い鉄腐食を有する。従って、これは、磁性ガラス粒子の重要な特徴である。好ましくは、水または1M HCl中の鉄腐食(20分間)は40ppmを下回り、より好ましくは20ppmを下回り、最も好ましくは10ppmを下回る。本発明の最も好ましい態様では、磁性ガラス粒子は、国際特許出願W001/37291に記載されているものであり、これは、Magna Pure LC DNA単離キットI(Roche, Mannheim, Germany)で市販されている。これらの粒子は、ゆっくり沈殿し、従って本発明による自動化された方法において有利に用いることができる。その生成を以下に要約する。

30

【0026】

磁性ガラス粒子は、実質的には球形であり、そして直径は小さく、そして直径5から500nmの少なくとも1つの磁性物体を含有する。これは、沈殿動態において驚くべき結果を有し、粒子の50%が特定の容量のエLEMENTから沈殿するまでのタイムスパンである半減時間の値、 $t_{1/2}$ 、により定量化される。イソプロパノール中での本発明の非修飾ガラス表面を有するMGPの3mg/ml重量/容量懸濁液の沈殿に関する半減期は、3分、好ましくは4分、より好ましくは6分を上回る。しかしながら、半減期に関する最も好ましい値は、10分、またはさらには20分を上回る。最も好ましいMGPの磁性物体は、例えば磁性色素でよい。磁性物体の大きさは、ナノスケールの範囲、すなわち5から500nm、好ましくは10から200nm、最も好ましくは15から50nmである。適切な磁性色素は、CERAC社により製造されており、平均直径23nmであり、そして $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ から成る(BET表面 $50\text{m}^2/\text{g}$ 、CERAC:P.O. Box 1178, Milwaukee, Wisconsin 53201-1178, USA; 商品番号I-2012)。本発明による最も好ま

40

50

しい磁性ガラス粒子は、MGPが高解像度走査性電子顕微鏡により測定される場合、 $0.5\mu\text{m}$ から $5\mu\text{m}$ 、好ましくは $1\mu\text{m}$ から $2\mu\text{m}$ の粒子直径を有しており、一方磁性物体は、前記したように5から500nm、好ましくは10から200nm、最も好ましくは15から50nmの範囲の直径を有しているという事実によりさらに特徴づけられる。従って、高解像度走査性電子顕微鏡により測定される場合、磁性色素核の磁性ガラス粒子に対する直径比率が1:10以下であることによりMGPはさらに特徴づけられる。最も好ましいMGPは、微孔性であるが、高度に構造化されており、従って $6\text{m}^2/\text{g}$ を超える比較的広い表面を有している。好ましくは、磁性ガラス粒子は、5から $100\text{m}^2/\text{g}$ 、好ましくは5から $90\text{m}^2/\text{g}$ 、より好ましくは10から $50\text{m}^2/\text{g}$ 、最も好ましくは15から $30\text{m}^2/\text{g}$ の範囲の表面積を有している。これは、自動化された市販の装置を用いるBraunauer-Emett-Teller法により決定することができる。この方法、いわゆるBET法の論議については、Braunauer、「The Absorption of Gases and Vapors」(1943)、Princeton University Pressを参照されたい。

#### 【 0 0 2 7 】

本発明で用いる磁性ガラス粒子は、本質的にはW001/37291に記載されている異なった処方で提供され得る。これを錠剤の形態で、粉末として、または好ましくは懸濁液として提供することができる。本発明の好ましい態様では、これらの懸濁液は、5から60mg/mlの磁性ガラス粒子(MGP)を含有する。本発明の別の態様では、場合によっては、カオトロピック剤を2から8モル/l、好ましくは4から6モル/lの濃度で含有してもよい緩衝水溶液に、シリカ含有材料を懸濁する。カオトロピック塩は、ヨウ化ナトリウム、過塩素酸ナトリウム、チオシアン酸グアニジニウム、イソチオシアン酸グアニジニウム、または塩酸グアニジニウムである。本発明によるカオトロピック剤は、液体の水の規則正しい構造の配置を変え、そしてこの剤がDNAまたはRNAを含有する溶液に存在する場合、DNAまたはRNAが本発明のMGPに結合する効果を有する任意の化学物質である。当業者に公知の別の化合物もまた可能である。

#### 【 0 0 2 8 】

本発明の好ましい態様では、磁性ガラス粒子は、W001/37291、W000/37291、およびW096/41811に記載されるゾル・ゲル法により製造され、とりわけゾル・ゲル法は：

- ゾル中に磁性物体を懸濁する工程；
- ゾルを加水分解して磁性物体をゲルで被覆する工程；
- ゲルで被覆された磁性物体を2ノズル噴霧ドライヤーで噴霧乾燥する工程；および
- 噴霧乾燥した粉末を焼結して磁性物体を被覆するゲルからガラスを形成する工程；を含む。

#### 【 0 0 2 9 】

本発明の好ましいMGPは、磁性色素としてミクロナ・マット・ブラックを含有するW000/32762の実施例8に従って製造された磁性ガラス粒子である。本発明の最も好ましいMGPは、国際特許出願W001/37291に従って製造され、これは、Magna Pure LC DNA単離キットI (Roche, Mannheim, Germany) でも提供される。これはまた、国際特許出願W001/37291に記載されるゾル・ゲル法により直径約23nmの磁性物体または色素を用いて生成される ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  から成り、CERAC製、CERAC: P.O. Box 1178, Milwaukee, Wisconsin 53201-1178, USA; 商品番号I-2012)。磁性物体をゲルに被覆した後、2液体ノズルを通してスラリーを噴霧して粉末を作製する。適切な噴霧乾燥システムは、Nubiosa Molekularzerstoubung、Ladish GmbH & Co. KG, Konstanz, Germanyにより作製される、例えば「Labor-Zerstoubungstrockner (LTK型)」またはBuchi AG, Uster, Switzerlandにより作製される、例えばMini Spray Dryer (B-191型) により作製される。磁性核のガラスシェルに対する直径比率が1:10以下、好ましくは1:10から1:1000であるので、組み込まれた磁性核またはその不活性担体のジオメトリーおよび数は、粒子の形状および大きさを決定しないが、製造条件、とりわけ噴霧乾燥中の条件を決定する。換言すれば、噴霧乾燥手順の間の圧力、入口温度、出口温度および流速の選択は、大きさ分布、ガラス滴の形状を決定する自由度であり、そしてそれによりMGPを修飾する。従って噴霧乾燥システムのノズルは加熱されている。入口温度は、 $120^\circ\text{C}$  から $500^\circ\text{C}$  の間、好ましくは $170^\circ\text{C}$  から $230^\circ\text{C}$ 、または $150^\circ\text{C}$

から230℃の間、最も好ましくは150℃から200℃、または190℃から210℃の間かまたは200℃で、もしくはそれよりわずかに低い。出口温度は、ゾルの沸点に、そしてそれにより溶媒に依存し、溶媒の沸点を超えても、それと同等でも、またはわずかに、すなわち10℃未満低くてもよい。エタノールを溶媒として用いる場合、50℃から300℃、好ましくは70℃から150℃、最も好ましくは80℃から110℃である。最適な温度は、90℃から100℃である。ノズル圧は、3バールを上回り、好ましくは4から6バールに制御されている。正確なパラメーターは、用いる噴霧乾燥システムに依存するという事実は技術者に理解されよう。しかしながら、技術者は、本発明の教示をいずれか別の噴霧乾燥システムに移すことができ、そして本発明の開示を考慮に入れることによりパラメーターを見出すことができる。

Masters: 「Spray Drying Handbook」 (1991)、John Wiley & Sons, New Yorkに記載される処方により、別の設定のためにはどのパラメーターを選択すべきかを見出す方法を導くことができる。好ましくは、噴霧乾燥システムのマニュアルについて問い合わせるか、または噴霧乾燥システム製造者の技術サービスに連絡するであろう。収量を最適化するために、焼きしまりまたは焼結温度は、できるだけ高く、すなわち融解範囲よりもわずかに低くすべきである。正確な温度は、ガラス組成に依存するが、400℃から1200℃の間である。W001/37291に記載されるEJガラス組成の場合、焼結温度は、720℃から770℃、好ましくはおよそ750℃である。本発明の教示を考慮に入れる場合、各々のガラス組成に関する温度を見出すのは技術者の技術範囲である。以後、粉末を200℃まで1時間加熱し、場合によっては、室温まで冷却してもよく、そして窒素環境下、加熱速度1K/分で750℃（焼きしまりまたは焼結温度）まで加熱し、そしてその温度を1時間維持する。次いで炉を150℃まで冷却し、そして空气中再度200℃まで1時間加熱する。室温まで冷却した後、粉末をふるい（50μm）に移し、そして30分間ふるいにかける。ふるいにかけたサンプルを瓶詰めし、200℃で4時間滅菌し、次いで80℃まで冷却する。次いでガラス溶液をオープンから取り、滅菌ホイルで被覆して閉鎖する。

【 0 0 3 0 】

（好ましくは磁性ガラス粒子の）、非修飾ガラスまたはシリカ表面への核酸の結合のための実験手順は、以下に詳細に記載できる。その手順は、1から8モル/l、および好ましくは2から6モル/lの濃度のカオトロピック塩の存在下で、好ましく実施される。カオトロピック塩は、ヨウ化ナトリウム、過塩素酸ナトリウム、チオシアン酸グアニジニウム、イソチオシアン酸グアニジニウム、または塩酸グアニジニウムでよい。本発明によるカオトロピック剤は、液体の水の規則正しい構造の配置を変え、そしてこの剤がDNA（またはRNA）含有溶液に存在する場合、DNA（またはRNA）が磁性ガラス粒子に結合する効果を有する任意の化学物質である。当業者に公知の別の生物学的物質もまた存在する。さらに別の物質もまた可能である。核酸および場合によっては別の生物学的化合物の混合物を結合させるために、非修飾ガラス表面を有するガラスビーズを混合物に加え、そして結合が生じるのに十分な時間インキュベートする。専門家は、通常インキュベーション工程の時間を熟知している。異なる時点で表面に固定されている核酸の量を決定することにより、この工程を最適化することができる。10秒から30分のインキュベーション時間が核酸に適當である。次いで亜硫酸水素塩反応の異なる工程を実施するための試薬を加える（または以前から存在していてもよい）。インキュベーションまたは洗浄の後、核酸を液体から分離する。これは、一般に重力により、または磁性ガラス粒子に結合している核酸に都合のよい場合は、磁場を適用することにより磁性ガラス粒子に結合している核酸を分離することにより、達成できる。例えば磁性粒子を、インキュベーションを行った容器の壁面に引き付けることができる。次いで磁性粒子に結合しなかった生物学的化合物または反応成分を含有する液体を除去することができる。用いる除去手順は、インキュベーションを行った容器の型に依存する。適切な工程として、ピペッティングまたは吸引による液体の除去が挙げられる。次いで、W099/40098に記載されるように、結合している核酸を含む材料を少なくとも1回、好ましくはエタノール70容量部と水30容量部の混合物（「70% エタノール」）または酸性洗浄溶液で洗浄できる。核酸および標的核酸の材料表面からの遊離を引き起こさないが、できるだけ完全に、望ましくない夾雑物を洗い流す洗浄溶液を使用する。好まし

くは、結合している核酸を含むガラスまたはシリカをインキュベートすることによりこの洗浄工程を行う。好ましくは、材料をこの工程中に再懸濁する。好ましくは、夾雑した洗浄溶液だけを前記した結合工程と同様に除去する。最後の洗浄工程後、材料を減圧下、簡単に乾燥させることができるか、または液体を蒸発させることができる。アセトンを用いる前処理工程を実施してもよい。

【 0 0 3 1 】

本発明の態様では、核酸は、本発明の固相および当業者に公知の方法を用いて生物学的サンプルから得られる。生物学的サンプルは、多細胞生物（例えば、ヒトおよび動物細胞）からの細胞（例えば白血球）、並びに免疫学的に活性な低および高分子化学化合物（例えば、ハプテン、抗原、抗体および核酸、血漿、脳脊髄液、喀痰、便、生検標本、骨髓、洗口液、血清、組織、尿またはその混合物）を含む。本発明の好ましい態様では、生物学的サンプルは、ヒトまたは動物体由来の液体である。好ましくは、生物学的サンプルは、血液、血漿、血清または尿である。血漿は、好ましくは、EDTA処理、ヘパリン処理、またはクエン酸処理した血漿である。核酸を含む生物学的サンプルを溶解して、核酸およびその他の成分を含む生物学的化合物の混合物を作る。生物学的サンプルを溶解する手順は、技術者に公知であり、そして本質的に化学的、酵素的または物理学的であり得る。これらの手順の組み合わせも、同様に適用できる。例えば、溶解は、超音波、高圧、剪断力、アルカリ、界面活性剤もしくはカオトロピック生理食塩水溶液、またはプロテアーゼもしくはリパーゼを用いて実施され得る。核酸を得るための溶解手順に関しては、詳細な参照は、Sambrookら；Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NYおよびAusubelら；Current Protocols in Molecular Biology 1987, J. Wiley and Sons, NYになされる。次いで、核酸は、本発明の方法および固相を用いて溶解混合物から単離され、次いで、本発明の方法、すなわち本発明の亜硫酸水素塩処理に供され得る。カオトロピック剤をまた用いて、細胞を溶解し、核酸と他の生物学的物質間で混合物を調製する（例えば、Sambrookら（1989）またはEP0389063参照）。その後、ガラスまたはシリカを含む材料が添加され、精製効果は、これらの条件下、すなわち特定の濃度のカオトロピック剤、より高濃度の有機溶媒の存在下または酸性条件下で、DNAまたはRNAがガラス表面を有する材料に結合する挙動から得られる。従って、本発明はまた、溶解工程および亜硫酸水素塩反応の組み合わせをも考慮し、すなわち核酸と他の生物学的物質との混合物から単離された核酸は、直接亜硫酸水素塩処理に供され、それにより、核酸は、脱アミノ工程および／または脱スルホン化工程中に固相に結合される。より詳細には、核酸中のシトシン塩基、好ましくは複数のシトシン塩基をウラシル塩基、好ましくは複数のウラシル塩基に変換、それにより好ましくは5-メチルシトシン塩基が有意には変換されない方法（「亜硫酸水素塩反応」または「亜硫酸水素塩処理」）が提供され、それにより、核酸が、固相、好ましくはガラスまたはシリカを含む材料に結合することにより、核酸と生物学的化合物とを含む混合物から単離され、亜硫酸水素塩反応の脱アミノ工程および／または脱スルホン化工程の間、固相に結合されたままである。さらにもっと詳細には、核酸が核酸と他の生物学的化合物との混合物から単離され、そして亜硫酸水素塩反応の脱アミノ工程および／または脱スルホン化工程の間、固相に結合されている方法が提供される、すなわち、

- a) 核酸と他の生物学的化合物との混合物を提供する工程；
- b) 核酸を固相に結合し、任意に他の生物学的化合物を除去し、そして任意に固相結合核酸を洗浄する工程；
- c) 亜硫酸水素イオンの存在下、固相結合核酸をインキュベートして、それにより核酸が脱アミノされる工程；
- d) 任意に脱アミノされた固相結合核酸を洗浄する工程；
- e) アルカリ条件下で脱アミノされた固相結合核酸をインキュベートして、それにより脱アミノされた核酸が脱スルホン化される工程；
- f) 任意に脱アミノされ、そして脱スルホン化された固相結合核酸を洗浄する工程；ならびに

g) 任意に脱アミノされ、そして脱スルホン化された核酸を固相から溶出する工程を含み、核酸中のシトシン塩基、好ましくは複数のシトシン塩基をウラシル塩基、好ましくは複数のウラシル塩基に変換し、それにより好ましくは5-メチルシトシン塩基が有意には変換されない方法（「亜硫酸水素塩反応」または「亜硫酸水素塩処理」）が提供される。

【 0 0 3 2 】

別の態様では、核酸が、核酸と他の生物学的化合物との混合物から単離され、そして亜硫酸水素塩反応の脱スルホン化工程の間、固相に結合されている方法が提供される、すなわち、

- a) 核酸と他の生物学的化合物との混合物を提供する工程；
- b) 核酸を固相に結合し、任意に他の生物学的化合物を除去し、任意に固相結合核酸を洗浄し、そして固相から核酸を溶出する工程；
- c) 亜硫酸水素イオンの存在下、溶出された核酸をインキュベートして、それにより核酸が脱アミノされる工程；
- d) 脱アミノされた核酸を固相に結合する工程；
- e) 任意に脱アミノされた固相結合核酸を洗浄する工程；
- f) アルカリ条件下で脱アミノされた固相結合核酸をインキュベートして、それにより脱アミノされた核酸が脱スルホン化される工程；
- g) 任意に脱アミノされ、そして脱スルホン化された固相結合核酸を洗浄する工程；ならびに

10

20

h) 任意に脱アミノされ、そして脱スルホン化された核酸を固相から溶出する工程；を含み、核酸中のシトシン塩基、好ましくは複数のシトシン塩基をウラシル塩基、好ましくは複数のウラシル塩基に変換し、それにより好ましくは5-メチルシトシン塩基が有意には変換されない方法（「亜硫酸水素塩反応」または「亜硫酸水素塩処理」）が提供される。

【 0 0 3 3 】

本発明の別の態様では、核酸が核酸と他の生物学的化合物との混合物から単離され、そして亜硫酸水素塩反応の脱アミノ工程の間、固相に結合されている方法が提供される、すなわち、

- a) 核酸と他の生物学的化合物との混合物を提供する工程；
- b) 核酸を固相に結合し、任意に他の生物学的化合物を除去し、そして任意に固相結合核酸を洗浄する工程；
- c) 亜硫酸水素イオンの存在下、固相結合核酸をインキュベートして、それにより核酸が脱アミノされる工程；
- d) 任意に固相結合核酸を洗浄する工程；
- e) 脱アミノされた核酸を固相から溶出する工程；
- f) アルカリ条件下で脱アミノされた核酸をインキュベートして、それにより脱アミノされた核酸が脱スルホン化される工程；

30

を含み、核酸中のシトシン塩基、好ましくは複数のシトシン塩基をウラシル塩基、好ましくは複数のウラシル塩基に変換し、それにより好ましくは、5-メチルシトシン塩基が有意には変換されない方法（「亜硫酸水素塩反応」または「亜硫酸水素塩処理」）が提供される。

40

【 0 0 3 4 】

本発明の好ましい方法は、さらに固相から結合核酸を溶出する工程を含む。次いで、該核酸は、例えば、増幅され得る。溶出を行うためには、（非修飾シリカ表面を有する）ガラスまたはシリカを含む材料が、カオトロピック剤およびまたは有機溶媒を全く含まないかまたは低量しか含まない溶液に再懸濁される。あるいは、懸濁液は、カオトロピック剤および／または有機溶媒を全く含まないかまたは低量しか含まない溶液で希釈され得る。この特性の緩衝液は、DE3724442およびJakobiら（前出）から公知である。塩含量の低い溶出緩衝液は、とりわけ0.2モル/l未満の含量を有する緩衝液である。とりわけ好ましい

50

態様では、溶出緩衝液は、緩衝目的でTris物質、とりわけおよそ7または7を超えるpHを有するTris緩衝溶液を含有する。別の特定の態様では、溶出緩衝液は、脱塩水である。核酸を含有する溶液は、固相が除去された後、ここで増幅反応に使用される準備ができています。従って、核酸は、増幅に必要な全ての試薬を含む新たな反応チューブに移される。任意に、増幅に必要な全ての試薬を含有する溶液は、固相および放出核酸の懸濁液に添加される。別の態様では、増幅に必要な全ての試薬を含有する溶液は、固相および結合核酸の懸濁液に溶出工程なしで添加し、それにより固相上の核酸の増幅が実施される。

#### 【 0 0 3 5 】

本発明によれば、洗浄および結合工程のために、好ましくは、分子生物学における方法、とりわけデオキシリボ核酸 (DNA) またはリボ核酸 (RNA) 精製方法に適した、液体が使用され、これらの方法は、特定の条件下でこれらの物質の固相、とりわけシリカまたはガラス表面、さらに特に磁性ガラス粒子への結合を利用する。好ましい液体は、アルコールおよび/またはケトン、あるいはそれと水との任意の混合物を含む。本発明に使用されるアルコールとしては、好ましくは、一般式 $R-OH$  (式中、 $R$ は一般式 $-(CH_2)_n-CH_3$  ( $n \geq 0$ ) を意味する) の第1級、第2級または第3級アルコールが挙げられる。しかしながら、分子生物学的目的に適している場合、他のアルコール、例えばグリセロールもまた使用され得る。特に適しているものは、アルコール類、イソプロパノール、エタノールまたはそれと水との混合物であり、好ましくはイソプロパノール80容量部と水20容量部との混合物である。本発明の別の態様では、液体は、ケトン、例えばアセトンを含む。さらに、適切な緩衝液水溶液が使用される。分子生物学的目的に適している緩衝液系は、Sambrook, J. 20  
ら「Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1989)」、J. Sambrook, E.F. FritschおよびT. Maniatis編、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NYにおいて見出すことができる。好ましい緩衝液物質は、Tris-ヒドロキシメチルアミン (TRIS)、リン酸塩、N-(2-ヒドロキシ-エチル) ピペラジン-N'-(2-エタンスルホン酸) (HEPES)、その塩または他の適切な物質である。さらに、溶液のイオン強度を変化させる物質、例えばNaCl、KClもしくはCaCl<sub>2</sub>または金属カチオン錯化剤、例えばエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) もしくはその塩が存在し得る。

#### 【 0 0 3 6 】

本発明の好ましい態様では、核酸は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR; EP0201184、EP-A-0 200362、米国特許第4683202号) で増幅される。増幅方法はまた、リガーゼ連鎖反応 (LC 30  
R, Wu, D.Y.およびWallace, R.B., Genomics 4: 560-569 (1989) およびBarany, F., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 189-193 (1991)) ; ポリメラーゼリガーゼ連鎖反応 (Barany, F., PCR Methods Appl. 1: 5-16 (1991)) ; ギャップPCR (PCT特許公開番号W090/01069) ; 修復連鎖反応 (欧州特許公開番号EP439182A2)、3SR (Kwoh, D.Y.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173-1177 (1989) ; Guatelli, J.C.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874-1878 (1990) ; PCT特許公開番号W092/0880A)、およびNASBA (米国特許第5130238号) でもよい。さらに、鎖置換増幅 (SDA)、転写媒介増幅 (TMA)、およびQ $\beta$ -増幅 (概説に関しては、例えばWhelen, A.C.およびPersing, D.H., Annu. Rev. Microbiol. 50: 349-373 (1996) ; Abramson, R.D.およびMyers, T.W., Curr. Opin. Biotechnol. 4: 41-47 (1993) 参照) がある。特に好ましい本発明の増幅方法は、米国特許第5786146号に開 40  
示されている、亜硫酸水素塩処理および対立遺伝子特異的PCR (例えば、米国特許第5137806号、米国特許第5595890号、米国特許第5639611号参照) を組み合わせたメチル化特異的PCR法 (MSP) である。

#### 【 0 0 3 7 】

好ましい態様では、方法はさらに増幅された核酸を検出する工程を含んでなることができる。当業者に公知であり、そして例えばSambrookら; Molecular Cloning, Cold Spring Harbor University Press (1989)、LottspeichおよびZorbas、「Bioanalytik」L. a. Zorbas編、Spectrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Germany、またはAusubel, F. 50  
ら、「Current Protocols in Molecular Biology」(1994)」、F. Ausubel、R. BrentおよびK. R. E. 編、Wiley & Sons Verlag, New Yorkに記載されている標準的な

分析方法により増幅された核酸を決定または検出することができる。標的核酸を検出する前に別の精製工程、例えば沈殿工程もある。検出方法には非限定例としては二本鎖DNAにインターカレートし、その後のその蛍光を変化させる臭化エチジウムのような特異的な染料の結合またはインターカレートさせることなどがある。精製された核酸を、任意に制限消化した後、電気泳動法により分離し、その後可視化することもできる。特異的配列に対するオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション、およびそれに続くハイブリッドの検出を利用するプローブ基盤のアッセイもある。当業者に公知の別の工程の後、標的核酸をシーケンシングすることもできる。別の方法により多様な核酸配列を特異的プローブが結合しているシリコンチップに適用し、相補的配列が結合した場合にシグナルを発生させる。

10

## 【 0 0 3 8 】

本発明のとりわけ好ましい態様では、増幅中の蛍光強度を測定することにより核酸を検出する。この方法はリアルタイムで蛍光をモニター観察する必要がある。蛍光強度を測定することにより増幅および検出を同時に利用する特に好ましい方法は、W092/02638および対応する米国特許第5,210,015号、米国特許第5,804,375号、米国特許第5,487,972号に開示されるTaqMan（登録商標）法である。この方法はポリメラーゼのエクソヌクレアーゼ活性を利用してシグナルを発生させる。詳細には、標的核酸の領域に相補的な配列を含有するオリゴヌクレオチドおよび同一の標的核酸鎖の第2の領域に相補的な配列を含有するが、第1のオリゴヌクレオチドにより定義される核酸配列を含まない標識オリゴヌクレオチドとサンプルを接触させて、ハイブリダイゼーション条件下で二本鎖の混合物を作製することを含んでなる方法により核酸を検出し、ここで二本鎖は、第1のオリゴヌクレオチドの3'末端が標識オリゴヌクレオチドの5'末端に隣接するように第1のオリゴヌクレオチドおよび標識オリゴヌクレオチドにアニーリングしている標的核酸を含んでなる。次いでポリメラーゼの5'から3'ヌクレアーゼ活性を許容するのに十分な条件下で5'から3'ヌクレアーゼ活性を有する鋳型依存性核酸ポリメラーゼでこの混合物を処理し、アニーリングされ、標識されたオリゴヌクレオチドを切断し標識フラグメントを遊離させる。標識オリゴヌクレオチドの加水分解により発生したシグナルを検出および／または測定する。TaqMan（登録商標）技術により、形成されて検出可能になる、固相に結合した反応複合体の必要性が排除される。より一般的には、本発明による方法の増幅および／または検出反応は均質溶液相アッセイである。さらに好ましい方法はLightCycler（登録商標）装置で用いられる様式である（例えば米国特許第6174670号参照）。とりわけ好ましいのは、亜硫酸水素塩処理、メチル化特異的プローブの存在下でのメチル化特異的プライマーを伴うかまたは伴わない増幅、および米国特許第6331393号に記載されるリアルタイム蛍光検出の使用である。

20

30

## 【 0 0 3 9 】

本発明の好ましい態様では、方法を自動化する、すなわち例えばW099/16781に記載されるような自動化できる方法を実施する。自動化できる方法とは、その方法の工程が、ヒトによる外的制御または影響がほとんどまたは全くなくて作動できる装置または機械で実施されるのに適していることを意味する。自動化された方法とは、自動化できる方法の工程が、ヒトによる外的制御または影響がほとんどまたは全くなくて作動できる装置または機械で実施されることを意味する。方法の準備工程のみが手動により行われなければならない、例えば貯蔵容器を充填し、そして配置しなければならない、サンプルの選択および当業者に公知の別の工程、例えば制御コンピューターの操作はヒトにより行われなければならない。装置または機械は例えば自動的に液体を添加するか、サンプルを混合するか、または特異的温度でインキュベーション工程を実施することができる。典型的にはかかる機械または装置は、単一の工程および命令が指定されているプログラムを実行するコンピューターにより制御されるロボットである。本発明の好ましい態様では、方法は高速大量処理様式であり、すなわち方法および使用する機械または装置が短時間で大量のサンプルに関して最適化されることを意味する高速大量処理様式で自動化された方法を実行する。

40

## 【 0 0 4 0 】

50



好ましくは本発明による方法は、診断分析のためもしくは生物分析のための、またはヒトもしくはさらには動物体からの組織もしくは液体のスクリーニングのための、特定のメチル化パターンの存在に関する診断において用いられる。さらに、本発明による方法を用いて核酸におけるメチル化部位の検出の速度、精度または感受性を増強させる。

#### 【 0 0 4 1 】

好ましい態様では、本発明は亜硫酸水素イオンの存在下、好ましくは5-メチルシトシン塩基は有意には変換されないで、核酸中のシトシン塩基、好ましくは複数のシトシン塩基がウラシル塩基、好ましくは複数のウラシル塩基に変換される反応（「亜硫酸水素塩反応」）の脱アミノおよび／または脱スルホン化工程における固相の使用に関する。好ましい態様では、本発明は、亜硫酸水素イオンの存在下、好ましくは5-メチルシトシン塩基は有意には変換されないで、核酸中のシトシン塩基、好ましくは複数のシトシン塩基がウラシル塩基、好ましくは複数のウラシル塩基に変換される反応（「亜硫酸水素塩反応」）の脱アミノおよび／または脱スルホン化工程における固相の使用に関する。さらにとりわけ、これは亜硫酸水素塩反応の脱アミノおよび／または脱スルホン化工程の間、固相を用いて核酸を結合させる、すなわち、亜硫酸水素塩反応の脱アミノおよび／または脱スルホン化工程の間、核酸は固相に結合されていることを意味する。好ましくは、固相はシリカまたはガラスを含んでなる物質である。最も好ましくは固相はガラスフリースまたはガラス膜である。最も好ましい態様では、固相は磁性ガラス粒子である。

#### 【 0 0 4 2 】

別の好ましい態様では、本発明は亜硫酸水素イオンおよび固相を含んでなる溶液を含有する亜硫酸水素塩反応を実施するためのキットに関する。好ましい態様では、固相はシリカまたはガラスを含んでなる物質である。より好ましい態様では、固相はガラスフリースまたはガラス膜である。最も好ましい態様では、固相は磁性ガラス粒子である。本発明の別の態様では、本発明による磁性ガラス粒子またはその懸濁物を含む貯蔵溶液を含んでなるパーツから成るキットが提供される。技術分野で公知のかかるキットはさらに亜硫酸水素塩手順の間に使用され得るプラスチック製品、例えば96もしくは384ウェル様式のマイクロタイタープレートまたは例えばEppendorf, Hamburg, Germanyにより製造された反応チューブを含んでなる。キットはさらに固相、とりわけガラスフリースもしくは膜または磁性ガラス粒子の洗浄工程に適した洗浄溶液を含んでなってもよい。洗浄溶液はしばしば使用前に希釈されなければならない貯蔵溶液として提供される。キットはさらに溶出剤、すなわち固相に結合しているDNAまたはRNAを溶出するための溶液またはバッファー（例えばTE、10mM Tris、1mM EDTA、pH8.0）または純粋な水を含んでなってもよい。さらに、本発明での使用に適したバッファーを含む別の試薬が存在してもよい。好ましくは、本発明によるキットは亜硫酸水素イオンの存在下、好ましくは5-メチルシトシン塩基は有意には変換されないで、核酸中のシトシン塩基、好ましくは複数のシトシン塩基がウラシル塩基、好ましくは複数のウラシル塩基に変換される反応に用いられる。

#### 【 0 0 4 3 】

以下の実施例、参照および図面は本発明の添付の請求の範囲で示される真の範囲の理解を助けるために提供される。本発明の精神から逸脱せずに、示した手順に修飾を行うことができることは理解される。

#### 【実施例】

#### 【 0 0 4 4 】

##### 1.1 実施例

##### 1. 実施例1：亜硫酸水素塩処理DNAに特異的なLC-PCRの確立

##### 1.1 一般論

亜硫酸水素塩反応が作用し、そして非メチル化シトシンをウラシルに変換するという事実は、ポリマーゼ連鎖反応により実証され、ここで非メチル化シトシンがウラシルに変換されている核酸配列の領域に特異的であるプライマーを使用する、すなわちプライマーのアデニン塩基は非メチル化シトシンからの亜硫酸水素塩反応生成物であるウラシルと向かい合っている。不完全な変換の場合、プライマーのアデニン塩基に対合しないシトシン

10

20

30

40

50

があるので、プライマーはこの領域にハイブリダイズできない。これはPCR生成物が得られるという効果を有する。

#### 【 0 0 4 5 】

迅速なポリメラーゼ連鎖反応を実施するための改善された方法が例えば米国特許第6,174,670号に開示されており、LightCycler（登録商標）装置（Roche, Mannheim, Germany）で用いられている。この方法では、2つの標識プローブは増幅依存的な様式で近くまで接近し、2つの標識が蛍光エネルギー転移（FRET）を行うことができるようになる。それによる増幅物の量は特定の波長の放出光の強度と相関する。従って適当なプローブおよびプライマーを用いて、例えばグルタチオン-S-トランスフェラーゼ遺伝子のプロモーター領域を分析することにより（例えばこの遺伝子の全長配列およびプロモーターに関しては配列番号：1、米国特許第5552277号、Genbank寄託番号M24485およびMorrowら、Gene75 : 3-11（1989）を参照）この特異的PCR法を用いて非メチル化シトシンの完全な変換が得られるかどうかを分析することができる。しかしながら、当業者は別の方法をこの評価に同様に用いることができることを知っている。蛍光測定は反応の初期のサイクルで得られる最初の蛍光測定、すなわちバックグラウンド蛍光で割ることにより正規化され、一方サイクル間の蛍光測定は相対的に一定であるようだ。最初の蛍光測定に選択されるサイクル数は比較される全ての反応に関して同一であり、全ての測定は同一の反応サイクルと相対的に増大することが示される。ポリメラーゼ連鎖反応増幅の初期サイクルにおいて標的分子数を幾何学的な等式： $N_i = N_0 \times (1 + E)^i$ 、ここで $N_0$ =反応の出発点での標的分子数、 $N_i$ =i番目のサイクルの完了時の標的分子数、 $E$ =増幅効率（ $0 \leq E \leq 1$ ）により記載することができる。この増幅のゲノム成長相の間、特定の閾値に到達するのに必要なサイクル数（ $C_T$ 値または交差点）は $(1 + E)$ の対数に反比例する。従って、 $C_T$ 値は反応間の比較を可能にする反応効率の尺度を示す。反応がより少ないサイクルで閾値に到達することを意味する $C_T$ 値の低下は、反応効率の増大を示している。増幅産物の増大は反応中の蛍光の増大を測定することによりモニター観察されるので、本明細書では $C_T$ は蛍光が任意の蛍光レベル（AFL）を越えるまでに実施された増幅サイクル数として定義される。AFLは蛍光基底レベル近くに選択されたが、測定された無作為の蛍光の変動の範囲を超え、増幅の幾何学的成長相の間に反応動態が測定された。後期サイクルにおける増幅産物の蓄積は反応を阻止し、そして実際に反応プラトーに導く。全反応のためにAFL1.5を選択した。PCR増幅は別個のサイクルからなり、そして蛍光測定をサイクルあたりに1回実施し、測定された蛍光は典型的には1サイクルでAFL未満からAFLより高くに増大する。測定の精度を改善するために、本明細書では $C_T$ 値または交差点と称されるAFL閾値に到達する「正確な」サイクル数はサイクル間の蛍光測定を補間することにより算出された。

#### 【 0 0 4 6 】

##### 1.2 一般的な方法

以下の実験は記載したLightCycler（登録商標）装置での記載されたPCRを亜硫酸水素塩処理DNAの評価手段として用いることができることを実証する。設計されたプライマー/プローブ組み合わせにより、亜硫酸水素塩処置の後のDNAのみで陽性の結果が得られる。亜硫酸水素塩処理DNA（この場合、亜硫酸水素塩DNAを実施例2に記載するプロトコルに従って処理した）および未処理DNAを同一の鋳型濃度（PCRあたり20ngおよび1ng）を用いて平行して増幅した。

#### 【 0 0 4 7 】

##### 1.3 LightCycler（登録商標）装置におけるPCR分析

###### 1.3.1 マスターミックスの組成

LS FastStart DNA Master HybridizationProbe 1x、2mM  $MgCl_2$ 、0.5  $\mu$ M フォワードプライマー、0.5  $\mu$ M リバースプライマー、250nM ドナープローブ、250nM アクセプタープローブ、鋳型10  $\mu$ l、全PCR容量20  $\mu$ l。

#### 【 0 0 4 8 】

##### 1.3.2 PCR条件

変性 10分/95℃

55サイクル      95℃ /10秒  
                     65℃ /10秒      シグナル獲得  
                     72℃ /10秒      ランプ時間    20℃ /秒

【 0 0 4 9 】

#### 1.4 結果

【表 1】

MDNA / PCR	亜硫酸水素塩処理	C <sub>T</sub> - 値または交差点
20 ng	あり	30.55
		29.72
		29.95
		30.06
1 ng	あり	34.7
		35.8
		34.07
		33.86
20 ng	なし	成長曲線なし
		成長曲線なし
		成長曲線なし
		成長曲線なし
1 ng	なし	成長曲線なし
		成長曲線なし
		成長曲線なし
		成長曲線なし

【 0 0 5 0 】

結果は亜硫酸水素塩処理したDNAに関してのみの交差点を示す。従ってこのPCRは亜硫酸水素塩法を評価するのに適している。当業者には、プライマー/プローブ組み合わせが亜硫酸水素塩処理の前にDNAと反応しないことが保証されれば、評価手段としていずれのPCRを用いるかは明白である。

【 0 0 5 1 】

#### 2. 実施例2：磁性ガラス粒子（MGP）を用いる亜硫酸水素塩反応

##### 2.1.1 DNAの変性

メチル化されたDNA（Intergen, Serologicals Corporation, Norcross, GA, USAより提供；Cat S 7821）希釈物（30ngおよび6ng/hDNA 1000ngバックグラウンドでスパイクしたアッセイ、Rocheカタログ番号1691112；濃度あたり10複製）100μlおよび2M NaOH 12μlを混合し、そして37℃で15分間インキュベートする。

【 0 0 5 2 】

##### 2.1.2 DNAの脱アミノ

変性DNA 112μlを亜硫酸水素塩試薬（2.5M 亜硫酸水素ナトリウム、125mM ヒドロキノン、pH5.0）200μlと混合物し、50℃で16時間インキュベートする。

【 0 0 5 3 】

#### 2.2 MGPを用いる加工

脱アミノDNA 312μlを結合バッファー（MagNaPure DNA単離キットI、Rocheカタログ番号3003990）600μlおよび磁性ガラス粒子溶液（MagNaPure DNA単離キットI）75μlと混合

し、そして絶えず攪拌しながら室温で15分間インキュベートする。その後、磁性ガラス粒子を70% エタノール1mlで3回洗浄する。磁気選別機 (Rocheカタログ番号1641794) で結合していないものを分離する。その後、90% EtOH/20mM NaOH 250 $\mu$ lをMGPに結合しているDNAに添加することにより脱スルホン化を行い；混合物を混合しながら室温で10分間インキュベートする。その後MGPを90% エタノールで2回洗浄する。エタノールの残りを除去するために、ふたを開けたサーモミキサー中で15分/60℃でMGPを加熱した。その後、10mM Tris/0.1mM EDTA pH7.5 (15分/60℃) 50 $\mu$ lでDNAを溶出する。溶出したDNA 10 $\mu$ lを次のPCR分析で用いる。

【 0 0 5 4 】

### 2.3 Intergenキットを用いる亜硫酸水素塩処理

10

メチル化したDNA (Intergen, Serologicals Corporation, Norcross, GA, USAより提供；カタログ番号S7821) 30ngおよび6ngをIntergen CpGenome DNA修飾キット (Intergen, Serologicals Corporation, Norcross, GA, USAより提供；カタログ番号S7820) の包装折り込みに記載されている方法に従って処理した (濃度あたり10複製)。溶出されたDNA 10 $\mu$ lを次のPCR分析に用いる。

【 0 0 5 5 】

### 2.4 LightCycler (登録商標) 装置 (ハイプロブ様式) における特異的PCRを用いて亜硫酸水素塩処理したDNAの検出

#### 2.4.1 マスターミックスの組成

LightCycler (登録商標) FastStart DNA Master HybridizationProbe 1x (Roche22392 2072)、2mM MgCl<sub>2</sub>、0.5 $\mu$ M フォワードプライマー、0.5 $\mu$ M リバースプライマー、250nM ドナープローブ、250nM アクセプタープローブ、鋳型10 $\mu$ l、全PCR容量20 $\mu$ l。

【 0 0 5 6 】

#### 2.4.2 PCR条件

変性 10分/95℃

55サイクル 95℃/10秒

65℃/10秒 シグナル獲得

72℃/10秒 ランプ時間 20℃/秒

MGP亜硫酸水素塩処理およびIntergen亜硫酸水素塩処理からのサンプルをLightCycler (登録商標) 装置の同一の作用で平行して作用させた。

30

【 0 0 5 7 】

#### 2.4.3 結果

【表 2】

複製	メチル化DNA		使用した亜硫酸水素塩法	
	亜硫酸水素塩	PCR	Intergen	MGP 法
			C <sub>T</sub> -値または交差点	
1	30 ng	6 ng	29.90	30.46
2			30.07	29.86
3			30.07	30.44
4			30.14	30.35
5			30.22	30.24
6			30.26	30.46
7			30.31	30.50
8			30.19	30.54
9			30.03	30.17
10			29.85	30.69
1	6 ng	1.2 ng	32.49	32.14
2			32.67	32.60
3			32.29	32.83
4			32.87	32.53
5			32.15	32.90
6			32.23	32.77
7			32.59	32.73
8			32.91	33.09
9			32.46	32.88
10			33.17	32.83

## 【 0 0 5 8 】

リアルタイムPCRの間に算出されたC<sub>T</sub>値または交差点は用いた双方の亜硫酸水素塩法に関してほとんど同一であり、すなわち方法の性能が同一である。

## 【 0 0 5 9 】

## 3. 実施例3：MGPを用いる自動化亜硫酸水素塩反応

## 3.1 亜硫酸水素塩反応の性能

## 3.1.1 DNAの変性

メチル化されたDNA (Intergen, Serologicals Corporation, Norcross, GA, USAより提供；カタログ番号S7821) 希釈物 (50ng/アッセイ) 20μl、ポリ (dA) 溶液 (濃度250ng/μl) 4μlおよび2M NaOH 2.6μlを混合し、そして37℃で10分間インキュベートする。

## 【 0 0 6 0 】

## 3.1.2 DNAの脱アミノ

変性DNA 26μlを亜硫酸水素塩試薬 (2.5M 亜硫酸水素ナトリウム、125mM ハイドロキノン、pH5.0) 220μlと混合し、50℃で4時間インキュベートする。

## 【 0 0 6 1 】

## 3.1.3 MagNaPure LC装置を用いる自動化処理

脱アミノDNA 250μlを結合バッファー (MagNaPure DNA単離キットI, Roche, Mannheim, Germany) 600μlおよび磁性ガラス粒子溶液 (MagNaPure DNA単離キットI, Roche, Mann 50

heim, Germany) 75  $\mu$ l と混合し、そして絶えず攪拌しながら室温で15分間インキュベートする。その後、磁性ガラス粒子を70% エタノール1mlで3回洗浄する。その後、90% EtOH/20mM NaOH 250  $\mu$ l をMGPに結合しているDNAに添加することにより脱スルホン化を行い；混合物を混合しながら室温で10分間インキュベートする。その後MGPを90% エタノールで2回洗浄し、10mM Tris/0.1mM EDTA pH7.5 (7分/80℃) 50  $\mu$ l で溶出する。

#### 【 0 0 6 2 】

3.1.4 LightCycler (登録商標) 装置 (ハイプローブ様式) における特異的PCRを用いることによる亜硫酸水素塩処理したDNAの検出

##### 3.1.4.1 マスターミックスの組成

LightCycler (登録商標) FastStart DNA Master HybridizationProbe 1x, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 10、0.5  $\mu$ M フォワードプライマー、0.5  $\mu$ M リバースプライマー、250nM ドナープローブ、250nM アクセプタープローブ、鋳型5  $\mu$ l、全PCR容量20  $\mu$ l。

#### 【 0 0 6 3 】

##### 3.1.4.2 PCR条件

変性 10分/95℃

55サイクル 95℃/10秒

65℃/10秒 シグナル獲得

72℃/10秒 ランプ時間20℃/秒

#### 【 0 0 6 4 】

##### 3.1.4.3 結果

#### 【表 3】

テンプレート	ng DNA	ng DNA	
	亜硫酸水素塩アッセイあたり	PCRあたり	交差点
ユニバーサルメチル化DNA	100	10	33.97
			36.66
ユニバーサルメチル化DNA	50	5	35.66
			35.82
			37.67
			38.37
ユニバーサルメチル化DNA	10	1	37.82
			39.89
			38.76
			39.85

#### 【 0 0 6 5 】

結果は用いた各々の濃度に関する交差点を示している。これは自動化された亜硫酸水素塩処理が成功したことを意味している。

#### 【 0 0 6 6 】

##### 4.実施例4：ガラスフリースを用いる亜硫酸水素塩反応の性能

##### 4.1 DNAの変性

メチル化されたDNA (Intergen, Serologicals Corporation, Norcross, GA, USAより提供；カタログ番号S7821) 希釈物 (30ngおよび6ng/アッセイ、各濃度当たり10複製) 100  $\mu$ l を2M NaOH 12  $\mu$ l と混合し、そして37℃で15分間インキュベートする。

#### 【 0 0 6 7 】

##### 4.2 DNAの脱アミノ

変性DNA 112  $\mu$ l を亜硫酸水素塩試薬 (2.5M 亜硫酸水素ナトリウム、125mM ハイドロ 50

20

30

キノン、pH5.0) 200  $\mu$ lとともに絶えず混合しながら16時間/50℃でインキュベートする。

【 0 0 6 8 】

4.3 ハイピュアPCR鋳型調製キット (Rocheカタログ番号1796828) での脱アミノされたDNAの処理

・脱アミノDNA312  $\mu$ lをキットからの結合バッファー200  $\mu$ lおよびイソプロパノール100  $\mu$ lと混合し、そしてガラスフリースを伴うカラムにピペティングする。次いでカラムをエッペンドルフ・テーブルトップ遠心機で遠心分離する (1分/8000rpm)。

・その後、カラムを80% エタノール500  $\mu$ lで各々3回洗浄する (遠心分離10秒/12000rpm)。

・脱スルホン化のために試薬 (38% エタノール/100mM NaCl/200mM NaOH) 250  $\mu$ lをカラムに加える。5分/室温のインキュベーションの後、遠心分離1分/800rpm。

・その後、カラムを80% エタノール500  $\mu$ lで各々2回洗浄する (遠心分離10秒/12000rpm)。

・最後に、予め加温した (70℃) 溶出バッファー (10mM Tris/0.1mM EDTA pH7.5) 50  $\mu$ lを加えることにより結合しているDNAを溶出し、遠心分離1分/800rpm。

【 0 0 6 9 】

4.4 LightCycler (登録商標) 装置 (ハイプローブ様式) における特異的PCRを用いることによる亜硫酸水素塩処理したDNAの検出

4.4.1 マスターミックスの組成

LightCycler (登録商標) FastStart DNA Master HybridizationProbe 1x (Roche 2239 272)、2mM MgCl<sub>2</sub>、0.5  $\mu$ M フォワードプライマー、0.5  $\mu$ M リバースプライマー、250 nM ドナープローブ、250nM アクセプタープローブ、鋳型10  $\mu$ l、全PCR容量20  $\mu$ l。

【 0 0 7 0 】

4.4.2 PCR条件

変性 10分/95℃

55サイクル 95℃/10秒

65℃/10秒 シグナル獲得

72℃/10秒 ランプ時間20℃/秒

【 0 0 7 1 】

4.4.3 結果

【表4】

メチル化DNA		C <sub>T</sub> -値または 交差点	メチル化DNA		C <sub>T</sub> -値または 交差点
亜硫酸水素塩 アッセイ	PCR		亜硫酸水素塩 アッセイ	PCR	
30 ng	6 ng	32.27	6 ng	1.2 ng	34.28
		32.01			35.70
		31.89			35.52
		33.23			36.23
		32.18			35.05
		32.63			35.60
		32.65			34.75
		32.26			34.86
		32.00			34.80
		31.84			34.93

【 0 0 7 2 】

30

40

50

結果は用いた各々の濃度に関する交差点を示している。これはガラスフリースを用いる亜硫酸水素塩処理が成功したことを意味している。

【 0 0 7 3 】

#### 5. 実施例5: ガラスフリース固相における亜硫酸水素塩反応の性能

##### 5.1 DNAのガラスフリースへの結合

DNA (hDNA (Roche) 1  $\mu$ gおよびメチル化DNA (Intergen, Serologicals Corporation, Norcross, GA, USAより提供; カタログ番号S7821) 100ngの混合物) 100  $\mu$ lを結合バッファ (ハイピュアPCR鋳型調製キット、Rocheカタログ番号1796828) 200  $\mu$ lおよびイソプロパノール100  $\mu$ lと混合物する。混合物をキットからのカラムにピペティングする。次いでカラムをエッペンドルフ・テーブルトップ遠心機で遠心分離する (1分/8000rpm)。フリースをキットからの洗浄バッファで2回洗浄する (洗浄工程あたり500  $\mu$ l)。

【 0 0 7 4 】

##### 5.2 ガラスフリースに結合したDNAの変性

38% EtOH/100mM NaOH/200mM NaCl 200  $\mu$ lをガラスフリースにピペティングし、室温で10分間双方をインキュベートすることにより変性をさせる。

【 0 0 7 5 】

その後フリースをキットからの洗浄バッファ500  $\mu$ lで1回洗浄する。

【 0 0 7 6 】

##### 5.3 ガラスフリースに結合したDNAの脱アミノ

脱アミノ溶液 (6.25M 尿素/2M 亜硫酸水素ナトリウム/pH5.0) 200  $\mu$ lを、DNAを伴うフリースにピペティングし、続いて水浴中50℃で16時間インキュベートする。

【 0 0 7 7 】

その後脱アミノ試薬を除去し、フリースをキットからの洗浄バッファ各々500  $\mu$ lで2回洗浄する。

【 0 0 7 8 】

##### 5.4 ガラスフリースに結合した脱アミノされたDNAの脱スルホン化

脱スルホン化のために試薬 (90% エタノール/20mM NaOH) 250  $\mu$ lをカラムに加える。15分/室温のインキュベーションの後、カラムを1分/8000rpmで遠心分離する。その後、カラムを各々80% エタノール500  $\mu$ lで2回洗浄する (10秒/12000rpm遠心分離)。

【 0 0 7 9 】

##### 5.5 DNAの溶出

最後に、予め加温した (70℃) 溶出バッファ (10mM Tris/0.1mM EDTA pH7.5) 50  $\mu$ lを加えることにより結合しているDNAを溶出し、遠心分離1分/8000rpm。

【 0 0 8 0 】

5.6 LightCycler (登録商標) 装置 (ハイプローブ様式) における特異的PCRを用いることによる亜硫酸水素塩処理したDNAの検出

##### 5.6.1 マスターミックスの組成

LightCycler (登録商標) FastStart DNA Master HybridizationProbe 1x (Roche 2239272)、2mM MgCl<sub>2</sub>、0.5  $\mu$ M フォワードプライマー、0.5  $\mu$ M リバースプライマー、250 nM ドナープローブ、250nM アクセプタープローブ、鋳型10  $\mu$ l、全PCR容量20  $\mu$ l。

【 0 0 8 1 】

##### 5.6.2 PCR条件

変性 10分/95℃

55サイクル 95℃/10秒

65℃/10秒 シグナル獲得

72℃/10秒 ランプ時間20℃/秒

【 0 0 8 2 】

##### 5.6.3 結果



【表 5】

サンプル番号	PCRあたりのメチル化DNA	交差点
1	20ng	34.90
2	20ng	35.27
3	20ng	36.09
4	20ng	36.80

【 0 0 8 3 】

10

各々の反応において、成長曲線が検出され、そして交差点が算出された。この結果はガラスフリース上での脱アミノおよび脱スルホン化が可能であることを示している。

【 0 0 8 4 】

## 参考文献一覧

- Abramson, R. D.およびMyers, T. W., Curr Opin Biotechnol 4 (1993) 41-7
- Alderton, R. P.ら、Anal Biochem 201 (1992) 166-9
- Ausubel, F.ら、「Current protocols in molecular biology」 (1994), F. Ausubel, R. BrentおよびK. R.E.編, Wiley & Sons Verlag, New York
- Barany, F., PCR Methods Appl 1 (1991) 5-16
- Barany, F., Proc Natl Acad Sci U S A 88 (1991) 189-93 20
- Benyajati, C.ら、Nucleic Acids Res 8 (1980) 5649-67
- Braunauer, 「The Adsorption of Gases and Vapors」 (1943), Princeton University Press
- Clark, S. J.ら、Nucleic Acids Res 22 (1994) 2990-7
- 独国特許第3724442号明細書
- 独国特許出願公開第37 34 442号明細書
- 欧州特許第0 200 362号明細書
- 欧州特許第0 201 184号明細書
- 欧州特許第0 389 063号明細書
- 欧州特許第0 439 182号明細書 30
- Feil, R.ら、Nucleic Acids Res 22 (1994) 695-6
- Frommer, M.ら、Proc Natl Acad Sci U S A 89 (1992) 1827-31
- 英国特許第91/00212号明細書
- Grigg, G.およびClark, S., Bioessays 16 (1994) 431-6
- Grigg, G. W., DNA Seq 6 (1996) 189-98
- Grunau, C.ら、Nucleic Acids Res 29 (2001) E65-5
- Guatelli, J. C.ら、Proc Natl Acad Sci USA 87 (1990) 1874-8
- Jakobi, R.ら、Anal Biochem 175 (1988) 196-201
- Komiyama, M.およびOshima, S., Tetrahedron Letters 35 (1994) 8185-8188
- Kwoh, D. Y.ら、Proc Natl Acad Sci U S A 86 (1989) 1173-7 40
- LottspeichおよびZorbas, 「Bioanalytik」 (1998), L. a. Zorbas編, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Germany
- Marko, M. A.ら、Anal Biochem 121 (1982) 382-7
- Morrow, C.S.ら、Gene 75 (1989), 3-11
- Oakeley, E. J., Pharmacol Ther 84 (1999) 389-400
- Olek, A.ら、Nucleic Acids Res 24 (1996) 5064-6
- Paulin, R.ら、Nucleic Acids Res 26 (1998) 5009-10
- Raizis, A. M.ら、Anal Biochem 226 (1995) 161-6
- Sambrook, J.ら、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」 (1989), Eds. J. Sambrook, E. F. FritschおよびT. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold S 50

pring Harbor, NY

Spray Drying Handbook (1991), John Wiley & Sons, New York

米国特許第4,683,202号明細書

米国特許第5,130,238号明細書

米国特許第5,137,806号明細書

米国特許第5,210,015号明細書

米国特許第5,234,809号明細書

米国特許第5,487,972号明細書

米国特許第5,552,277号明細書

米国特許第5,595,890号明細書

10

米国特許第5,639,611号明細書

米国特許第5,786,146号明細書

米国特許第5,804,375号明細書

米国特許第6,174,670号明細書

米国特許第6,331,393号明細書

Vogelstein, B.およびGillespie, D., Proc Natl Acad Sci U S A 76 (1979) 615-9

Warnecke, P. M.ら、Methods 27 (2002) 101-7

Whelen, A. C.およびPersing, D. H., Annu Rev Microbiol 50 (1996) 349-73

国際公開第00/32762号パンフレット

国際公開第00/37291号パンフレット

20

国際公開第01/37291号パンフレット

国際公開第01/98528号パンフレット

国際公開第02/31186号パンフレット

国際公開第90/01069号パンフレット

国際公開第90/06045号パンフレット

国際公開第92/02638号パンフレット

国際公開第92/0880A号パンフレット

国際公開第96/41811号パンフレット

国際公開第99/16781号パンフレット

国際公開第99/40098号パンフレット

30

Wu, D. Y.およびWallace, R. B., Genomics 4 (1989) 560-9

【産業上の利用可能性】

【0085】

本発明は、核酸におけるメチル化の位置、すなわちメチル化および非メチル化シトシンを決定するために利用することができる。

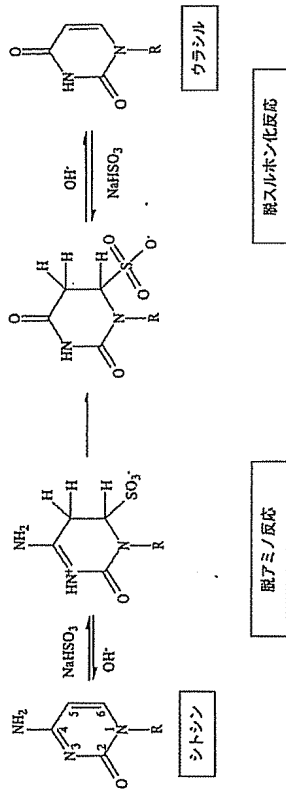
【図面の簡単な説明】

【0086】

【図1】図1は、亜硫酸水素塩と核酸中のシトシンとの反応を示した図である。

【 図 1 】

亜硫酸水素塩と核酸中のシトシンとの反応



【 配 列 表 】

2004089195000001. app

---

フロントページの続き

(72)発明者 ディルク ブロック

ドイツ連邦共和国 ビッヒル 8 3 6 7 3 クロイトヴェーク 1 0

Fターム(参考) 4B024 AA20 CA01 HA20